

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :

2 754 268

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

96 15888

⑤1 Int Cl<sup>6</sup> : C 09 J 189/06, A 61 L 25/00 // (C 09 J 189/06, 105:02,  
103:10)

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 23.12.96.

③0 Priorité : 07.10.96 FR 9612200.

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 10.04.98 Bulletin 98/15.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : SOCIETE ANONYME DE  
DEVELOPPEMENT DES UTILISATIONS DU  
COLLAGENE S.A.D.U.C SOCIETE ANONYME — FR.

⑦2 Inventeur(s) : TARDY MICHEL, VOLCKMAN HERVE,  
TIOILLIER JEROME, GRAVAGNA PHILIPPE et  
TAYOT JEAN LOUIS.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : CABINET LAVOIX.

⑤4 COMPOSITION ADHESIVE A BASE DE POLYALDEHYDE MACROMOLECULAIRE ET PROCEDE DE  
RETICULATION DE COLLAGENE OU DE GELATINE.

⑤7 La présente invention concerne une composition ad-  
hésive biocompatible, biorésorbable et non toxique, à  
usage chirurgical et/ou thérapeutique, notamment pour la  
liaison de tissus biologiques entre eux ou avec un biomaté-  
riau implanté, caractérisé en ce qu'elle comprend au moins  
un polyaldéhyde macromoléculaire biodégradable.

Cette composition peut comprendre en outre du colla-  
gène ou de la gélatine solubilisé.

L'invention concerne également un procédé de réticula-  
tion du collagène ou de la gélatine permettant d'obtenir no-  
tamment une composition adhésive telle que précitée,  
comprenant le fait de mélanger à du collagène ou de la gé-  
latine solubilisé, préalablement à sa réticulation, au moins  
un polyaldéhyde macromoléculaire biodégradable.

L'invention concerne également l'utilisation d'un polyal-  
déhyde macromoléculaire biodégradable pour l'obtention  
d'une telle composition adhésive ainsi qu'un kit.

FR 2 754 268 - A1



La présente invention se situe dans le domaine des colles biologiques biodégradables et non toxiques destinées à un usage chirurgical ou thérapeutique.

5 D'une manière plus précise, la présente invention a trait à une composition adhésive biocompatible, biorésorbable et non toxique, à base d'au moins un polyaldéhyde macromoléculaire.

10 Elle concerne également un procédé de réticulation de collagène ou de gélatine solubilisé permettant d'obtenir notamment une telle composition adhésive.

La réticulation du collagène peut être réalisée soit par voie chimique, à l'aide d'agents tannants tels que le glutaraldéhyde ou le formaldéhyde  
15 ou encore le diisocyanate ou d'autres réactifs, soit par des agents physiques tels que les radiations gamma, bêta ou ultraviolettes.

Cependant, cette dernière méthode est lourde et parfois difficile à mettre en oeuvre et, outre les  
20 réticulations, elle provoque aussi des coupures.

En ce qui concerne la voie chimique, le traitement par le glutaraldéhyde (ou le formaldéhyde), est le traitement le plus souvent utilisé pour réticuler le collagène et consiste à immerger dans une solution de  
25 glutaraldéhyde des poudres, des films, des gels ou des solutions plus ou moins concentrées en collagène. Il présente un certain nombre d'inconvénients selon les applications. L'introduction de glutaraldéhyde dans une structure collagénique aqueuse peut notamment entraîner  
30 un relargage rapide de glutaraldéhyde en excès, par diffusion à travers le gel formé.

En chirurgie ou thérapie, ceci est à l'origine de réactions toxiques, entraînant des nécroses

tissulaires, ou des réactions moins sévères, conduisant à une mauvaise cicatrisation ou à son ralentissement. C'est le cas de l'adhésif collagénique aujourd'hui disponible sur le marché.

5                    Dans cette colle, nommée GRF, la réticulation de la gélatine est réalisée par le formaldéhyde en présence de résorcinol, ce dernier servant essentielle-  
10                    ment à réduire la dissolution de la masse adhésive. Cette colle a été utilisée entre les années 60 et les années  
15                    80 mais en fait son emploi en chirurgie est maintenant restreint à quelques applications rares où le bénéfice l'emporte sur les risques (dissection aortique) en raison de la possibilité de relargage du formaldéhyde et de sa toxicité. Une quantité excessive de formaldéhyde est  
20                    nécessaire pour obtenir une réticulation rapide du gel collagénique et une bonne adhésion aux tissus environnants. Cet excès de formaldéhyde est responsable de la mauvaise biocompatibilité de la colle GRF. On ne peut donc généraliser aujourd'hui l'emploi de cette colle à  
25                    la cicatrisation des plaies chirurgicales ou chroniques, à la protection ou l'étanchéité de sutures ou encore à la délivrance de médicaments.

                  Une amélioration récente vient d'être proposée en augmentant la viscosité du milieu qui  
25                    contient le formaldéhyde, le glutaraldéhyde ou autre dialdéhyde, par addition d'un gelifiant tel que l'agarose (Demande de brevet IZORET G., WO 96/14368). Cependant, ceci ne supprime pas le risque de diffusion de l'agent réticulant même si la diffusion est ralentie.

30                    Par ailleurs, la biocompatibilité du collagène réticulé par des agents chimiques toxiques peut être améliorée en réduisant au minimum la quantité d'agents réticulants employés. C'est ce qui est réalisé dans des matériaux préformés destinés à être implantés, où le  
35                    temps de réaction peut être allongé autant que nécessaire

par le fabricant du matériau. Dans ce cas, de faibles quantités d'agent réticulant sont employées et le matériau réticulé est lavé soigneusement en fin de préparation pour éliminer tout excès de réactif.

5 Le matériau réticulé final utilisé par le chirurgien est dans ce cas un solide ou une suspension de fibres collagéniques, mais ces matériaux sont dépourvus d'adhésivité aux tissus environnants.

10 L'obtention d'une colle biologique nécessite souvent le mélange, par le chirurgien lui-même, au contact des tissus biologiques à traiter, de deux solutions différentes permettant une réticulation rapide du collagène, de la gélatine ou de tout autre macromolécule ou molécule réactive.

15 On connaît par exemple la colle commercialisée par la Société IMMUNO sous le nom de "TISSUCOL" (TISSEEL) puis par BEHRINGWERKE sous le nom de "BERIPLAST" et par BIOTRANSFUSION sous le nom de "BIOCOL". Il s'agit d'une solution concentrée de fibrinogène (70-140 mg/ml) contenant du facteur XIII et de la fibronectine dont la polymérisation est induite par une solution de thrombine (4 à 400 Unités Internationales) dans un mélange extemporané. Le fibrinogène polymérise ensuite en fibrine pour reformer un coagulum qui assure  
20 l'adhésion des tissus mis en contact.

25 Les difficultés et problèmes majeurs soulevés par ce produit et ses composants sont d'une part, l'absence de caractérisation complète et de reproductibilité de la quantité de chacun des composants de la solution de fibrinogène (Facteur XIII, fibronectine, aprotinine) ; et d'autre part, la difficulté d'inactivation virale d'un tel produit vis-à-vis des virus non enveloppés comme des Agents Transmissibles Non Conventionnels. Ceci a conduit à une limitation de la  
30 possibilité d'utiliser de tels produits à grande échelle.

TARDY et Coll., (Demande de brevet français n° 9400715), ont décrit un adhésif biologique collagénique qui peut être préparé grâce à un kit constitué par exemple de deux seringues séparées contenant respectivement une solution de collagène (ou gélatine) oxydé par le périodate de sodium et conservé à pH acide sous forme congelée à une température inférieure à 0°C, de préférence de l'ordre de -20°C, et une solution alcaline aqueuse. Le mélange des contenus respectifs est assuré par un mélangeur connecté aux deux seringues, après réchauffage du gel de collagène (ou gélatine) oxydé aux environs de 40°C, pour obtenir un adhésif biocompatible dont la réticulation est accomplie en 2 à 3 minutes.

Les propriétés de cet adhésif sont intéressantes dans certaines applications, mais le problème principal de cette technologie est la nécessité d'une chaîne de froid complexe pour la distribution de ce produit, ce qui en augmente le coût et en gêne l'emploi dans des locaux non équipés de congélateur.

On a également proposé d'utiliser des dérivés réactifs du polyéthylène glycol pour former des colles biologiques à base d'albumine ou de collagène (Brevet BARROWS et Col. - n° WO 96 031 59 A1 ; SIERRA D. - Tissue Sealants Meeting La Jolla, 1996). Cependant, ces réactifs sont peu stables dans l'eau et peuvent nécessiter des modes de conservation particuliers. Leur pH optimum d'activité est alcalin, non physiologique. D'autre part, le temps de résorption de ces produits est très long, supérieur à 3 à 4 semaines, ce qui, dans certaines applications, est un inconvénient majeur.

La nécessité incontournable d'obtenir rapidement et quelquefois presque instantanément, la solidification d'une solution fluide pour obtenir une adhésion forte, peut rendre nécessaire l'emploi d'un excès de réactifs chimiques de réticulation qui provoque la

toxicité et la médiocre biocompatibilité tissulaire.

L'invention a pour objectif de fournir une composition adhésive ne présentant pas les inconvénients majeurs évoqués précédemment.

5 Elle a ainsi pour objectif de fournir une composition adhésive biocompatible, biorésorbable et non toxique, adaptée à un usage chirurgical et/ou thérapeutique, qui soit stable dans le temps et pouvant être conservée dans des conditions relativement simples tout  
10 en étant d'utilisation aisée, notamment injectable à l'aide d'aiguilles ou de cathéters.

Elle a encore pour objectif de fournir une composition adhésive présentant des propriétés d'adhésion et de résistance mécanique améliorées.

15 Un autre objectif de l'invention est en particulier de fournir une composition adhésive avec laquelle la réticulation du collagène ou de la gélatine s'effectue très rapidement et dont la vitesse puisse être facilement modulée.

20 Un autre objectif est encore de fournir une composition adhésive ne présentant pas de risque de toxicité en particulier par diffusion de l'agent réticulant.

25 Un objectif de l'invention est aussi de fournir une composition adhésive pour la liaison de tissus biologiques, y compris des tissus vivants, entre eux ou avec un biomatériau implanté.

30 L'invention a par ailleurs pour objectif de fournir un procédé de réticulation du collagène (ou gélatine) permettant l'obtention notamment d'une telle composition adhésive, qui soit facile à mettre en oeuvre.

35 L'invention a encore pour objectif de fournir des kits comprenant une composition adhésive telle que précitée, à usage chirurgical et/ou thérapeutique, d'utilisation simple et pratique.

A cette fin, l'invention a pour objet une composition adhésive biocompatible, biorésorbable et non toxique, à usage chirurgical et/ou thérapeutique, notamment pour la liaison de tissus biologiques entre eux ou à un biomatériau implanté, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polyaldéhyde macromoléculaire biodégradable.

L'invention a aussi pour objet une composition adhésive, caractérisée en ce qu'elle comprend d'une part, du collagène ou de la gélatine solubilisé et d'autre part, au moins un polyaldéhyde macromoléculaire biodégradable.

L'invention fournit également un procédé de réticulation du collagène ou de la gélatine permettant d'obtenir notamment une composition adhésive biocompatible, biorésorbable et non toxique, à usage chirurgical et/ou thérapeutique, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape consistant à mélanger à du collagène ou de la gélatine solubilisé, préalablement à sa réticulation, au moins un polyaldéhyde macromoléculaire biodégradable.

L'invention a encore pour objet l'utilisation de polyaldéhyde macromoléculaire biodégradable pour l'obtention d'une composition adhésive biocompatible, biorésorbable et non toxique, à usage chirurgical et/ou thérapeutique notamment pour la liaison de tissus biologiques entre eux ou à un biomatériau implanté présentant des fonctions réactives aminées vis-à-vis dudit polyaldéhyde.

Enfin l'invention a pour objet des kits pour composition adhésive biocompatible, biorésorbable et non toxique, destinés à un usage chirurgical et/ou thérapeutique, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une solution contenant au moins un polyaldéhyde macromoléculaire biodégradable.

L'invention a aussi pour objet des kits pour

composition adhésive comprenant :

- une solution de collagène ou de gélatine,
- une solution contenant au moins un polyaldéhyde macromoléculaire biodégradable,
- 5        - des moyens de mélange pour mélanger extemporanément lesdites solutions.

Les inventeurs ont découvert, de manière tout à fait inattendue, les propriétés potentiellement adhésives de polyaldéhydes macromoléculaires biodégradables sur les tissus vivants et l'aptitude des adhésifs  
10        qui en découlent, à être extrêmement bien tolérés par l'organisme receveur tout en conservant leurs propriétés adhésives pendant leur séjour dans l'organisme.

Ils ont ainsi découvert que l'on pouvait  
15        coller des tissus biologiques, y compris des tissus vivants, entre eux ou avec un biomatériau implanté, celui-ci présentant des fonctions réactives vis-à-vis des polyaldéhydes macromoléculaires, notamment des fonctions aminées.

Les inventeurs ont découvert de manière  
20        surprenante que l'on pouvait obtenir une colle biologique en apportant l'excès de réactifs chimiques nécessaire à la réticulation de collagène ou de gélatine sous forme d'un polyaldéhyde macromoléculaire biodégradable et que  
25        cette colle présente des propriétés améliorées notamment au niveau de la qualité d'adhésion et de la résistance mécanique.

Ce polyaldéhyde macromoléculaire peut être aisément préparé par oxydation de polysaccharides ou de  
30        mucopolysaccharides avec notamment l'acide périodique ou ses sels, selon un procédé connu en soi depuis très longtemps. De telles préparations de polysaccharide oxydé ont déjà été autrefois proposées pour réticuler et stabiliser des matériaux collagéniques solides dans des  
35        documents anciens (brevet US-A-3 093 439 Johnson &



Johnson et GB-A-1 109 509 Unilever), mais rien n'est mentionné au sujet de l'application de cette méthode à des solutions ou gels de collagènes ni de gélatines solubles.

Or, les inventeurs ont découvert qu'en  
5 utilisant un tel agent réticulant, on n'observait pas le phénomène de diffusion de celui-ci, phénomène très problématique dans les colles biologiques connues, notamment la colle GRF, en particulier du point de vue de la toxicité et de la biocompatibilité tissulaire.

10 Ils ont découvert en particulier que le polyaldéhyde macromoléculaire, en apportant la quantité nécessaire d'aldéhyde dans la solution de collagène ou de gélatine, va se trouver emprisonné à l'intérieur du gel adhésif qu'il aura permis de former.

15 Le polyaldéhyde macromoléculaire mis en oeuvre selon l'invention consiste avantageusement en un polysaccharide ou mucopolysaccharide oxydé.

Parmi les polysaccharides ou mucopolysaccharides convenant à la réalisation de l'invention,  
20 on peut citer l'amidon, le dextrane, l'agarose, la cellulose, la chitine, le chitosan, l'acide alginique, les glycosaminoglycanes, l'acide hyaluronique et le chondroïtine sulfate ou leurs dérivés.

Selon l'invention, l'amidon et le dextrane  
25 sont préférés.

Les polyaldéhydes peuvent être utilisés seuls ou en mélanges.

Conformément à l'invention, le polyaldéhyde peut résulter de l'oxydation d'un composé précité par  
30 l'acide périodique ou l'un de ses sels, de préférence le périodate de sodium, selon des procédés connus en soi.

Pour se faire, on ajoute à la solution de polysaccharide ou mucopolysaccharide une solution d'acide périodique ou d'un de ses sels jusqu'à l'obtention d'une  
35 concentration comprise entre 0,01 et 1 M, de préférence

0,25 à 0,5 M.

L'étape d'oxydation peut être opérée sur des solutions, des gels ou des suspensions de polysaccharide(s).

5 On peut également prévoir d'ajuster le pH en fonction des groupes fonctionnels ou des groupes chargés présents sur le polysaccharide ou encore en fonction de sa solubilité.

10 La préparation de polysaccharide oxydé peut ensuite être soumise à des dialyses, diafiltrations, filtrations, ultrafiltrations dans le but d'éliminer les produits de la réaction d'oxydation et des réactifs, ainsi que des dérivés iodés formés pendant la réaction, ou en excès.

15 On peut également prévoir une lyophilisation, la solubilisation du polyaldéhyde avec de l'eau étant ensuite très facile à obtenir.

20 La composition adhésive selon l'invention comprend au moins un polyaldéhyde macromoléculaire tel que défini ci-dessus.

Il peut s'agir d'une solution aqueuse comprenant de préférence de 2,5 à 5 % en poids de polyaldéhyde(s).

25 La solution est stable à l'abri de l'air et est conservée de préférence entre +1°C et +25°C.

Cette composition adhésive est avantageusement utilisée pour la liaison de tissus biologiques entre eux ou à un biomatériau implanté.

30 La température d'application de la solution de polyaldéhyde est comprise de préférence entre 18 et 37°C.

35 Dans le cas d'un biomatériau implanté, celui-ci présente des fonctions réactives vis-à-vis du ou des polyaldéhydes contenus dans la composition qui sont formées en particulier par des fonctions aminées.

Le matériau peut comprendre du collagène ou de la gélatine comme décrit ci-après.

On prévoit avantageusement un temps de contact entre le biomatériau et la composition adhésive, de l'ordre de 10 secondes à 3 minutes préalablement à l'application "in situ" dudit matériau.

Le collage se produit progressivement en général entre 10 secondes et 3 minutes à pH physiologique, à une température de l'ordre de 37-40°C.

On peut contrôler ce temps de collage et le temps de dégradation in vivo de l'adhésif formé en fonction de la concentration de la solution de polyaldéhyde macromoléculaire ainsi que selon le taux d'oxydation du polysaccharide comme indiqué ci-après.

Selon un second mode de réalisation de l'invention, la composition adhésive comprend une solution contenant au moins un polyaldéhyde macromoléculaire telle que définie précédemment ainsi qu'une solution de collagène ou de gélatine.

Selon l'invention, le terme "collagène" désigne indifféremment le collagène ou la gélatine résultant d'une opération de chauffage ou de tout autre méthode.

Le collagène utilisé selon l'invention peut être d'origine humaine ou animale, de type I, III ou IV ou issu de leur mélange.

On peut employer de préférence du collagène natif ou pepsiné, non hydrolysé dont les chaînes sont constituées en majorité de chaînes  $\alpha$  de poids moléculaire voisin de 100 kDa.

Le collagène de départ peut également être modifié chimiquement par méthylation, par succinylation ou tout autre méthode connue.

On peut aussi utiliser de la gélatine du commerce, mais de manière non préférée.

Conformément à l'invention, le collagène est mis en oeuvre sous forme de solution.

Pour cela, le collagène est solubilisé dans de l'eau dans des conditions stériles, en chauffant  
5 avantageusement à une température appropriée comprise entre 40 et 70°C.

Les conditions de solubilisation seront adaptées en fonction du collagène utilisé.

La préparation de collagène peut être soumise  
10 ensuite à une filtration dans des conditions stériles, en maintenant la température entre 40 et 70°C.

Selon l'invention, la solution de collagène peut être une solution de 10 à 20 %, 15 % de préférence.

Selon une variante de l'invention, notamment  
15 pour des préparations de collagène à concentration élevée, la solution peut être diluée dans des conditions stériles et utilisée pour obtenir directement une composition adhésive selon l'invention.

Selon une autre variante, si une concentra-  
20 tion élevée est nécessaire, par exemple de l'ordre de 20 % ou plus, celle-ci peut être obtenue par lyophilisation de la solution diluée stérile précitée puis redissolution de la poudre stérile par de l'eau stérile dans une enceinte stérile, ce qui permet de réaliser  
25 l'opération sans risque de contamination.

D'une manière générale, le collagène est chauffé au-dessus de 37°C et perd ainsi la majeure partie de sa structure hélicoïdale en triple hélice. On peut assimiler la préparation finale à de la gélatine mais  
30 dont le poids moléculaire des chaînes élémentaires est supérieur ou égal à 100 000 Daltons.

Dans le cas où l'on utilise de la gélatine hydrolysée du commerce, il est préférable d'augmenter sa concentration entre 20 et 40 % environ.

35 Si l'on souhaite garder la structure hélicoï-

dale du collagène, notamment pour augmenter le temps de dégradation in vivo, la solution n'est pas chauffée. On préfère alors préparer des solutions moins concentrées, entre 0,2 et 5 % environ.

5                   Le procédé de réticulation selon l'invention comprend le fait de mélanger les deux solutions précitées. On réalise avantageusement un mélange homogène.

                  Le polyaldéhyde est mélangé au collagène ou gélatine selon des proportions de 1 à 20 % en poids, de  
10                   préférence de 3 à 10 % en poids.

                  Le mélange des solutions précitées est opéré de préférence à pH neutre, physiologique, et à une température comprise entre 37 et 50°C, de préférence de l'ordre de 40 à 42°C environ. Des températures plus  
15                   élevées peuvent être utilisées en particulier si une plus grande fluidité est souhaitée, notamment pour application en spray.

                  La composition adhésive et le procédé de réticulation selon l'invention peuvent être mis en oeuvre  
20                   notamment pour arrêter le saignement de plaies tissulaires, pour lier des tissus biologiques entre eux ou à un biomatériau implanté, pour la cicatrisation des plaies chirurgicales ou chroniques, pour la protection ou l'étanchéité des sutures, pour l'inhibition de la forma-  
25                   tion d'adhérences post-opératoires ou encore la délivrance de médicaments selon un système de libération prolongée, ainsi qu'en chirurgie réfractive de l'oeil, en particulier l'épikératoplastie.

                  L'invention trouve une application particulière-  
30                   lièrement avantageuse dans la prévention de la formation d'adhérences post-opératoires.

                  Elle permet également le collage de lentilles, en particulier de lentilles en collagène, sur la cornée dans le domaine de la chirurgie réfractive de  
35                   l'oeil.

Par le mélange de la solution de collagène ou gélatine et de la solution de polyaldéhyde macromoléculaire, le gel homogène et visqueux obtenu se prend en masse progressivement et durcit rapidement en adhérant  
5 fortement par exemple aux tissus biologiques sur lesquels il est appliqué.

Selon l'invention, on peut contrôler le temps de réticulation en diminuant la concentration de la solution de polyaldéhyde ou en diminuant la quantité mise  
10 en oeuvre (pour une même proportion de collagène).

La polymérisation se produit progressivement en général à partir de 15 à 30 secondes à pH physiologique à une température de l'ordre de 37 à 40°C.

On peut cependant augmenter le temps de polymérisation au-delà de 30 secondes notamment par dilution de la solution de polyaldéhyde macromoléculaire, notamment en dessous de 5 % ou en diminuant la quantité de polyaldéhyde par rapport à la quantité de collagène.  
15 Par exemple, des concentrations de polyaldéhyde macromoléculaire comprises entre 5 et 1 % permettent de moduler le temps de polymérisation d'une solution de gélatine à 15 %, respectivement de 15 secondes à 5  
20 minutes.

Selon une variante de l'invention, on peut également ajuster le temps de résorption in vivo de l'adhésif formé en modifiant le taux d'oxydation du polysaccharide mis en oeuvre pour l'obtention du polyaldéhyde macromoléculaire utilisé. Celui-ci peut ainsi être ajusté entre 1 à 2 jours et 30 à 60 jours.  
25

A cette fin, on peut avantageusement réduire les concentrations finales en périodate de sodium entre 0,05 M et 0,1 M.  
30

D'une manière générale plus la concentration en polyaldéhyde est augmentée plus le temps de résorption augmente également.  
35

Si le mélange des solutions précitées est appliqué à une température inférieure à 37°C, la polymérisation est complétée par une solidification induite par la gélification du collagène en dessous de 37°C.

5 L'invention fournit également des kits destinés à un usage chirurgical ou thérapeutique notamment pour les applications citées précédemment.

Selon une première forme de réalisation, le kit comprend une solution contenant au moins un poly-  
10 aldéhyde macromoléculaire biorésorbable placée dans une seringue.

On emploie de préférence une solution aqueuse contenant 2,5 à 5 % en poids de polyaldéhyde(s).

Selon une autre forme de réalisation de  
15 l'invention, le kit peut se présenter avantageusement sous la forme de deux seringues dont chacune comprend respectivement la solution de collagène ou gélatine et la solution de polyaldéhyde macromoléculaire. Les seringues sont fixées à un dispositif de maintien équipé  
20 de moyens de mélange conçus pour pouvoir mélanger extemporanément leur contenu de manière homogène, après les avoir réchauffées à la température appropriée selon la fluidité souhaitée.

Le kit peut comprendre une solution de  
25 collagène de 10 à 20 % et une solution de polyaldéhyde de 1 à 5 %.

La composition adhésive selon l'invention, et notamment le kit décrit ci-dessus, présente l'avantage de pouvoir être stockée entre + 1 et + 25°C, avantageu-  
30 sement à température ambiante, ce qui en réduit le coût de distribution et facilite son emploi.

D'autre part, selon l'invention le temps de réticulation peut être raccourci en dessous de 5 minutes et contrôlé selon les exigences requises.

35 Parallèlement, la force de collage développée

par le produit selon l'invention est supérieure à celle obtenue avec les colles connues, et notamment les colles de fibrine, tout en conservant une excellente biocompatibilité.

5                   En outre, l'invention offre avantageusement la sécurité d'emploi liée aux méthodes de préparation du collagène efficaces pour l'élimination des virus et prions (Agents Transmissibles Non Conventionnels) notamment par l'emploi d'un traitement acalin. Ceci  
10 écarte un des problèmes majeurs soulevés par les colles de fibrine.

De plus, par rapport à ces colles de fibrine, la viscosité de la composition adhésive selon l'invention est supérieure et facilite ainsi son adhésion immédiate.

15                   L'invention va être décrite plus en détails à l'aide des exemples donnés ci-après à titre indicatif et non limitatif.

**Exemple 1 : Réalisation d'une solution de polyaldéhyde macromoléculaire.**

20                   On ajoute à une solution d'Amidon soluble purifié ou de Dextran présentant ou non des charges positives (groupements aminés) ou négatives (groupements carboxyliques ou sulfoniques) ou tout autre groupement fonctionnel, dont le poids moléculaire peut varier de  
25 10 000 à 2 millions Daltons, à une concentration de 5 % en eau, une solution d'acide périodique ou de périodate de sodium jusqu'à l'obtention d'une concentration comprise entre 0,01 et 1M, de préférence 0,25 M.

Après 2 heures de contact à la température du  
30 laboratoire, la solution est dialysée (ou diafiltrée à l'aide d'un ultrafiltre) avec une membrane de seuil de coupure 5 000 Daltons, contre de l'eau distillée ou une solution aqueuse tamponnée de pH neutre. La dialyse est poursuivie jusqu'à l'élimination totale des produits  
35 dialysables de la réaction d'oxydation et des réactifs,



ainsi que des dérivés iodés formés pendant la réaction, ou en excès.

La solution finale concentrée de polymère polyaldéhydique dérivé du polysaccharide initial est  
5 ensuite saturée en azote par bullage et conditionnée stérilement par filtration sur membrane de porosité 0,2  $\mu$ .

Le produit est stable pendant au moins un an entre +4°C et 25°C, à l'abri de l'air.

10 Pour la réalisation d'un kit selon l'invention, on conditionne la solution préparée en seringues.

**Exemple 2 : Réalisation d'une solution de collagène.**

On prépare une solution acide de collagène à 15 % par dissolution d'une poudre de collagène acide dans  
15 l'eau, à une température comprise entre 40°C et 70°C pendant 30 minutes.

La solution est neutralisée à pH 7,5 par addition de soude normale dès que la fluidité le permet.

Dans le cas du collagène bovin de type I, il  
20 peut être acidosoluble (extrait de dermes et de tendons à pH acide), ou solubilisé par digestion à la pepsine, ce qui le rend plus facile à filtrer par la suite.

Dans le cas des collagènes humains d'origine placentaire, ils peuvent être préparés par extraction à  
25 la pepsine selon le procédé décrit dans la demande EP-A-0 214 035.

Bien entendu, d'autres sources de collagène peuvent être utilisées parmi celles connues par l'homme du métier.

30 Puis la solution de collagène ainsi chauffée, fluidifiée et neutralisée, est filtrée stérilement sur membrane de porosité 0,2  $\mu$  à la suite de préfiltrations sur filtres de porosité progressivement décroissante, à une température appropriée entre 40°C et 70°C.

35 Si la filtration à une concentration en

collagène de 20 % (ou plus) ne peut être réalisée, on dilue la solution collagénique préalablement à sa filtration.

5 Selon une variante, on lyophilise la solution diluée stérile puis on redissout la poudre stérile par de l'eau stérile dans une enceinte stérile à la concentration désirée.

Le produit est stable pendant au moins un an à température ambiante.

10 Pour la réalisation d'un kit selon l'invention, la solution de collagène ainsi obtenue peut être aisément répartie en seringues à température de 40°C.

**Exemple 3 : Réalisation d'un mélange adhésif.**

15 On prépare une seringue de 0,5 ml de polyaldéhyde macromoléculaire à 5 % selon l'exemple 1, et une seringue de 2 ml de collagène à 15 %, selon l'exemple 2. Chacune des seringues est fixée à un dispositif de maintien équipé d'un mélangeur conçu pour pouvoir mélanger leur contenu respectif de manière homogène après  
20 les avoir réchauffées à une température de 40°C à 42°C, voire plus si une plus grande fluidité est souhaitée.

Le gel homogène et visqueux obtenu en sortie se prend en masse à cette même température, progressivement à partir de 15 à 30 secondes à pH physiologique et  
25 durcit rapidement en adhérant fortement aux tissus biologiques sur lesquels il est appliqué.

Si le mélange est appliqué sur une surface tissulaire ou sur une plaie dont la température est inférieure à 37°C, la polymérisation induite par la  
30 réaction chimique entre les fonctions aldéhydes et les fonctions amines du collagène, est complétée par une solidification résultant de la gélification du collagène en dessous de 37°C.

Le temps de polymérisation peut être augmenté  
35 au delà de 30 secondes par dilution du polyaldéhyde

macromoléculaire en dessous de 5 % ou en utilisant une quantité par seringue inférieure à 0,5 ml pour 2 ml de collagène.

Des concentrations de polyaldéhyde macromoléculaire comprises entre 5 et 1 % permettent de moduler le temps de polymérisation, respectivement de 15 secondes à 5 minutes.

Il est possible aussi d'utiliser une solution à 5 % de polysaccharide moins oxydé, préparé par exemple avec une concentration finale de périodate de sodium comprise entre 0,05 M et 0,1 M, en variante de l'exemple 1.

#### TEST D'ADHESIVITE

On mesure la force développée par l'adhésif tissulaire ainsi préparé, en appliquant le mélange décrit ci-dessus entre deux lambeaux de peau de porc de 6,25 cm<sup>2</sup>, eux-mêmes reliés séparément par collage avec une colle acrylique du côté épidermique sur deux plateaux d'un dyanomètre.

Après avoir appliqué le produit mélangé et fluide à 40°C sur chacun des deux lambeaux sur la face dermique, les deux plateaux sont aussitôt rapprochés pour comprimer le tout avec une force de 4 Newtons pendant 1 minute puis on incube à 37°C pendant 30 minutes.

Lorsque les plateaux sont séparés progressivement, on mesure la résistance à la rupture des deux lambeaux.

La force mesurée est de 7,26 Newtons. Le travail fourni pour lutter contre la résistance à l'étirement est de 10,96 millijoules.

Dans les mêmes conditions, la colle de fibrine "TISSUCOL" donne une force de 6,30 Newtons et de 11,25 millijoules.

#### Exemple 4 :

Les force ou travail de l'exemple 3 peuvent

être augmentés du double ou du triple en augmentant la concentration du collagène ou du polyaldéhyde macromoléculaire, comme illustré ci-après :

On prépare une seringue de 0,5 ml d'une solution de polyaldéhyde macromoléculaire à 5 % selon l'exemple 1, et une seringue de 2 ml de collagène à 20 %, selon une variante de l'exemple 2.

On procède comme à l'exemple 3.

Dans le test d'adhésivité, la force mesurée est de 12,15 Newtons, et le travail fourni pour lutter contre la résistance à l'étirement est de 27,72 millijoules.

**Exemple 5 : collage d'une lentille en collagène avec une solution de polyaldéhyde macromoléculaire sur une cornée de lapin et sur une cornée de primate non humain.**

Pour réaliser le collage d'une lentille en collagène, on maintient les paupières ouvertes avec un blépharostat, on désépithélialise la cornée sur une zone plus large que le diamètre de la lentille, puis on lave soigneusement la zone désépithélialisée pour éliminer les débris cellulaires.

On dépose la solution de polyaldéhyde à 2,5 % ou 5 % préparée selon la procédure de l'exemple 1, dans la face concave de la lentille jusqu'à remplir complètement la concavité de celle-ci avec la solution de polyaldéhyde.

Après 30 secondes à 2 minutes de contact, on sèche la surface cornéenne, on élimine l'excédent de solution de polyaldéhyde par aspiration, puis on place la face concave de la lentille sur la cornée, en prenant soin de centrer la lentille par rapport à l'axe optique.

Le bord de la lentille est correctement plaqué contre la cornée à l'aide d'une spatule.

Après 5 minutes de contact, il est possible de mobiliser le globe oculaire par l'intermédiaire d'une

spatule posée sur la lentille.

Dans ces conditions, l'utilisation de polyaldéhyde macromoléculaire à une concentration comprise entre 2,5 et 5 %, n'induit pas de réaction inflammatoire clinique sur les structures antérieures du globe oculaire : cornée, conjonctive, iris, paupières, ni chez le lapin albinos (New Zealand) ni chez le primate non humain (*Macacuscynomolgus*).

Cette absence de réactions toxiques ou d'irritation locales souligne l'avantage de la composition adhésive selon l'invention par rapport à l'utilisation des agents réticulants traditionnels de l'art antérieur, pour la réalisation d'adhésifs tissulaires.

**Exemple 6 : Prévention de la formation d'adhérences post-opératoires.**

Le modèle expérimental utilisé pour démontrer les propriétés de l'adhésif selon l'invention dans la prévention d'adhérences postopératoires a été publié par Elisabeth HARRIS et l'équipe de George RODEHEAVER (Surgery, 117, 6, 663-669, 1995).

Le protocole décrit dans cette publication a été mis en oeuvre sur des groupes de 10 rats.

Les essais consistent à créer une abrasion et une déshydratation sur des surfaces de 2 cm<sup>2</sup> de paroi péritonéale et de caecum, au contact l'une de l'autre.

Le groupe de rats témoins ne reçoit aucun produit de protection des plaies ainsi créés ; il est comparé au groupe de rats qui reçoit de 1 ml à 2 ml de l'adhésif tissulaire de l'invention selon l'exemple 3, en utilisant un kit comprenant deux seringues comme décrit dans cet exemple, l'adhésif étant appliqué sur chacune des deux plaies en regard l'une de l'autre.

Après 7 jours d'attente, conformément au protocole publié, les résultats sont nets :

Aucune adhérence n'est observée entre les

deux surfaces lésées dans le groupe de rats traités par l'adhésif tissulaire selon l'invention.

5 Le groupe de rats témoins, non traité par l'adhésif tissulaire de l'invention, montre des adhérences pour chacun des 10 rats, dont les caractéristiques sont identiques aux résultats publiés dans Surgery 117, 6, 663-669, 1995 mentionné ci-dessus.

10 Il ressort de cette même publication (table II, page 667), que la colle de fibrine (Fibrin sealant), n'est pas efficace pour inhiber complètement la formation d'adhérences post-opératoires.

15 Les propriétés anti-adhérences démontrées pour l'adhésif tissulaire de cette invention sont particulièrement surprenantes quand on les compare à celles des colles de fibrine qui n'ont pas ces propriétés.

20 Selon l'invention, on peut appliquer la composition adhésive formant barrière anti-adhérences en un endroit précis, y compris par injection à travers un cathéter, sans risque de voir bouger cette barrière, ce qui renforce la sécurité et l'efficacité pour le patient traité.

## REVENDEICATIONS

1. Composition adhésive biocompatible, biorésorbable et non toxique, à usage chirurgical et/ou  
5 thérapeutique notamment pour la liaison de tissus biologiques entre eux ou à un biomatériau implanté, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polyaldéhyde macromoléculaire biodégradable.

2. Composition adhésive selon la revendica-  
10 tion 1, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre du collagène ou de la gélatine solubilisée.

3. Composition adhésive selon la revendica-  
tion 1 ou 2, caractérisée en ce que le polyaldéhyde  
15 consiste en un polysaccharide ou mucopolysaccharide oxydé.

4. Composition adhésive selon l'une quelcon-  
que des revendications précédentes, caractérisée en ce  
que le polysaccharide ou mucopolysaccharide est choisi  
20 parmi le groupe comprenant l'amidon, le dextrane, l'agarose, la cellulose, la chitine, le chitosan, l'acide alginique, les glycosaminoglycanes, l'acide hyaluronique et le chondroïtine sulfate ou leurs dérivés.

5. Composition adhésive selon l'une quelcon-  
que des revendications précédentes, caractérisée en ce  
25 que le polysaccharide est choisi parmi l'amidon et le dextrane.

6. Composition adhésive selon l'une quelcon-  
que des revendications précédentes, caractérisée en ce  
que le polyaldéhyde consiste en un polysaccharide ou  
30 mucopolysaccharide oxydé par l'acide périodique ou l'un de ses sels.

7. Composition adhésive selon l'une quelcon-  
que des revendications précédentes, caractérisée en ce  
que le polysaccharide présente un poids moléculaire  
35 compris entre environ 10 000 et 2 millions Daltons.

8. Composition adhésive selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend une solution aqueuse de polyaldéhyde(s) selon une concentration de 2,5 à 5 % en poids.

5 9. Composition adhésive selon l'une quelconque des revendications 2 à 7, caractérisée en ce que le collagène consiste en du collagène natif ou pepsiné, non hydrolysé, composé essentiellement de chaînes  $\alpha$  de poids moléculaire voisin de 100 kDa.

10 10. Composition adhésive selon l'une quelconque des revendications 2 à 9, caractérisée en ce que, pour le mélange, la proportion du polyaldéhyde par rapport au collagène est de 1 à 20 % en poids, de préférence 3 à 10 %.

15 11. Composition adhésive selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est résorbable dans l'organisme entre 1 à 2 jours et 30 à 60 jours.

20 12. Procédé de réticulation du collagène ou de la gélatine permettant d'obtenir notamment une composition adhésive biocompatible, biorésorbable et non toxique, à usage chirurgical et/ou thérapeutique, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape consistant à mélanger à du collagène ou de la gélatine solubilisé,  
25 préalablement à sa réticulation, au moins un polyaldéhyde macromoléculaire biodégradable.

30 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le polyaldéhyde macromoléculaire est obtenu par oxydation d'un polysaccharide ou mucopolysaccharide.

35 14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 12 et 13, caractérisé en ce que le polysaccharide ou mucopolysaccharide est choisi parmi le groupe comprenant l'amidon, le dextrane, l'agarose, la cellulose, la chitine, le chitosan, l'acide alginique,



les glycosaminoglycanes, l'acide hyaluronique et le chondroïtine sulfate ou leurs dérivés.

15        15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, caractérisé en ce que le polysaccharide est choisi parmi l'amidon et le dextrane.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 15, caractérisé en ce que le polysaccharide présente un poids moléculaire compris entre 10 000 et 2 millions Daltons.

10        17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 16, caractérisé en ce que l'oxydation du polysaccharide ou mucopolysaccharide est réalisée à l'aide d'acide périodique ou l'un de ses sels.

15        18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que la concentration finale en acide périodique ou ses sels est comprise entre 0,01 et 1 M de préférence entre 0,25 et 0,5 M.

20        19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 18, caractérisé en ce que le collagène consiste en du collagène natif ou pepsiné, non hydrolysé, composé essentiellement de chaînes  $\alpha$  de poids moléculaire voisin de 100 kDa.

25        20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 19, caractérisé en ce que l'on réalise le mélange à une température comprise entre 37 et 50°C.

21. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que l'on réalise le mélange à une température de l'ordre de 40 à 42°C.

30        22. Procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 21, caractérisé en ce que l'on réalise le mélange à un pH neutre, physiologique.

35        23. Procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 22, caractérisé en ce que la réticulation est réalisée en moins de 5 minutes.

24. Utilisation d'un polyaldéhyde macromoléculaire biodégradable pour l'obtention d'une composition adhésive biocompatible, biorésorbable et non toxique, à usage chirurgical et/ou thérapeutique, notamment pour la liaison de tissus biologiques entre eux ou à un biomatériau implanté présentant des fonctions réactives aminées vis-à-vis dudit polyaldéhyde.

25. Utilisation selon la revendication 24, en combinaison avec du collagène ou de la gélatine.

26. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 24 et 25, caractérisée en ce que le polyaldéhyde consiste en un polysaccharide ou mucopolysaccharide oxydé.

27. Utilisation selon la revendication 26, caractérisée en ce que le polysaccharide ou mucopolysaccharide est choisi parmi le groupe comprenant l'amidon, le dextrane, l'agarose, la cellulose, la chitine, le chitosan, l'acide alginique, les glycosaminoglycanes, l'acide hyaluronique et le chondroïtine sulfate ou leurs dérivés.

28. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 24 à 27, caractérisée en ce que le polyaldéhyde consiste en un polysaccharide ou mucopolysaccharide oxydé par l'acide périodique ou l'un de ses sels.

29. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 24 à 28, caractérisée en ce que la proportion du polyaldéhyde macromoléculaire par rapport au collagène est de 1 à 20 % en poids, de préférence 3 à 10 %.

30. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 24 à 29, pour l'obtention d'une composition adhésive à temps de résorption, dans l'organisme, compris entre 1 à 2 jours et 30 à 60 jours.

31. Utilisation selon l'une quelconque des

revendications 24 à 30, pour la liaison d'une lentille en collagène.

32. Kit comprenant une composition adhésive biocompatible, biorésorbable et non toxique, destiné à un usage chirurgical et/ou thérapeutique, notamment pour la liaison de tissus biologiques entre eux ou à un biomatériau implanté, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une solution contenant au moins un polyaldéhyde macromoléculaire biodégradable.

33. Kit selon la revendication 32, caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme d'une seringue.

34. Kit selon la revendication 32 ou 33, caractérisé en ce qu'il comprend une solution aqueuse de polyaldéhyde(s) selon une concentration comprise entre 2,5 et 5 % en poids.

35. Kit selon la revendication 32, caractérisé en ce qu'il comprend en outre :

- une solution de collagène ou de gélatine,  
- des moyens de mélange pour mélanger extemporainement la solution contenant au moins un polyaldéhyde macromoléculaire et la solution de collagène ou de gélatine.

36. Kit selon la revendication 35, caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme de deux seringues équipées de moyens de mélange dont l'une des seringues contient la solution de collagène ou de gélatine et l'autre contient la solution de polyaldéhyde macromoléculaire.

37. Kit selon l'une quelconque des revendications 35 et 36, caractérisé en ce qu'il comprend une solution de collagène de 10 à 20 % et une solution de polyaldéhyde de 1 à 5 %.

38. Kit selon l'une quelconque des revendications 32 à 37, caractérisé en ce que la ou les solutions

sont maintenues à une température comprise entre + 1 et 25°C.

5           39. Kit selon l'une quelconque des revendications 32 à 38, caractérisé en ce que le polyaldéhyde consiste en un polysaccharide ou mucopolysaccharide oxydé.

10           40. Kit selon l'une quelconque des revendications 32 à 38, caractérisé en ce que le polysaccharide ou mucopolysaccharide est choisi parmi le groupe comprenant l'amidon, le dextrane, l'agarose, la cellulose, la chitine, le chitosan, l'acide alginique, les glycosaminoglycanes, l'acide hyaluronique et le chondroïtine sulfate et leurs dérivés.

15           41. Kit selon l'une quelconque des revendications 32 à 38, caractérisé en ce que le polyaldéhyde consiste en un polysaccharide ou mucopolysaccharide oxydé par l'acide périodique ou l'un de ses sels.

20           42. Kit selon l'une quelconque des revendications 32 à 41, caractérisé en ce que le collagène consiste en du collagène natif ou pepsiné, non hydrolysé, composé essentiellement de chaînes  $\alpha$  de poids moléculaire voisin de 100 kDa.

INSTITUT NATIONAL

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 537479

FR 9615888

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	POLYMER GELS AND NETWORKS, vol. 1, 1993, GB, pages 213-224, XP000677632 E. SCHACHT ET AL.: "Some aspects of the crosslinking of gelatin by dextran dialdehydes" * page 213, ligne 1 - ligne 4 * * page 214, ligne 30 - ligne 39 * * page 215, ligne 6 - ligne 10 * ---	12-18, 20-23
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 116, no. 10, 9 Mars 1992 Columbus, Ohio, US; abstract no. 85407, "Gelatin-based adhesives for bookbinding" XP002034188 * abrégé * & JP 03 239 781 A (NITTA GELATIN INC.) 25 Octobre 1991 * abrégé * ---	1-8,10, 12-29, 32,35, 38-41
A	US 3 057 723 A (R.A. JEFFREYS ET AL.) 9 Octobre 1962 -----	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		A61L C09J C09H C08H
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
2 Juillet 1997		Mazet, J-F
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 0182 (P04C13)

